從無可救藥到不藥而癒：一個抗病毒冬瓜品種的前世、今生與未來

鄧汀欽[1]、林子凱[2]、蔣國司[3]、胡仲祺[4]、廖吉彥[1]、蔡錦慧[1]、林玫珠[1]

1. 農業試驗所植物病理組。台中市霧峰區。臺灣。
2. 農業試驗所作物組。台中市霧峰區。臺灣。
3. 國立中興大學農藝學系。台中市南區。臺灣。
4. 國立中興大學生物科技學研究所。台中市南區。臺灣。

摘　　要

臺灣瓜類栽植面積廣且種類多，由於週年種植的結果，病毒危害嚴重，農藥濫用仍無法有效控制，惟在病害管理上採用栽培抗病品種才能突破此項生產的限制因子，過程不但無須施用農藥，其結果也能經濟有效地防治病毒病害。但是自然界真正具抗病性的種質難尋，實務上抗病種原的基因也經常無法有效運用。本文描述我們在瓜類育種的過程中，發現有一冬瓜品系具有良好的先天抗病毒之特性，針對此品系進行一系列的遺傳分析、相關抗病基因的蒐尋、鑑定與應用，再以之回交地方栽培種，將抗病基因導入育成新的商業品種，通過品種權審議，命名為「台農 2 號」冬瓜，以品種技術授權移轉給 2 家種子公司，經推廣栽培後，原先冬瓜生產管理時無藥可救的病毒病，現已可不須施藥即能防治。這項抗病品種的運用創造了種苗商與栽培業者共同的利益，同時避免了農藥濫用，自然維護了生態的安全，未來冬瓜抗病毒基因的深層研究與加值應用也是本文闡釋的內容。

關鍵詞：瓜類栽植、病毒、病害管理、抗病基因、種質

緒　　言

臺灣氣候極適合各種瓜類栽植，栽培面積廣且種類繁多，根據 2018 年農業統計年報，葫蘆科作物中越瓜、胡瓜、冬瓜、苦瓜、西瓜、香瓜及洋香瓜等的生產面積共 19,599 公頃 (表一)，此外尚有南瓜、絲瓜、稜角絲瓜及扁蒲等廣泛栽培及

少數蛇瓜或梨瓜等零星栽培而未列入統計。由於瓜類作物週年不間斷種植的結果，造成各種病蟲害的發生與蔓延不止，其中尤以病毒病為害最嚴重，因農藥也無法有效防治，為多數瓜類作物生產的限制因子。臺灣紀錄感染瓜類的病毒至少有 17 種，這些病毒在不同瓜類的發生情形各有所異，單獨或複合感染造成植株不同程度的病徵，輕者僅葉片出現嵌紋或黃化，植株生育減緩，重者葉片及果實畸型，頂芽壞疽，植株生長停止或死亡，影響瓜果品質及產量。且病毒可經由汁液、種子、蚜蟲、薊馬、粉蝨或污染的土壤等方式傳播，植株一旦罹病就無法以農藥治癒，即使針對媒介昆蟲進行防治也只能亡羊補牢，事倍而功半，徒然增加防治成本與藥劑汙染。在集約栽培的環境下，應用抗病品種是最經濟有效的病毒病害管理策略，歷年來我們在瓜類育種過程中，發現有一冬瓜品系具有抵抗病毒，甚至完全不被感染的免疫特性，因此針對此品系進行持續的免疫性機制探討、遺傳分析、相關抗病基因的蒐尋、鑑定與應用等，並以之回交地方栽培種，導入抗病基因育成新的商業品種，經特性篩選檢定等試驗，於 2006 年 12 月通過品種權審議命名為「台農 2 號」，目前該品種已授權技術移轉給 2 家種子公司，經推廣栽培後已使冬瓜生產時原先無藥可救的病毒病，演化到不須施藥即可防治的境界。此項抗病品種的運用，節省了栽培業者的管理成本，創造了種苗商的利基，同時也免除了農藥的濫用，自然維護了生態的安全，本文的部分資料已在 2006 年台法合作計畫結案報告的研討會[16] 及「作物病害管理技術研討會」[12]發表，但未作成研究論文正式發表，未來將持續對冬瓜抗病毒基因進行更深層的研究與加值應用。

表一、2018年臺灣瓜類生產面積及產量

Table 1. Cucurbit planted areas and yields in Taiwan, 2018

瓜種類 (Cucurbitaceous crop)	種植面積 (公頃) Planted area (ha)	產量 (公噸) Yield (m.t.)
越瓜 (Oriental pickling melon)	189	3,232
胡瓜 (Cucumber)	1,987	51,224
冬瓜 (White gourd)	1,019	22,643
苦瓜 (Bitter gourd)	1,520	30,225
西瓜 (Watermelon)	10,603	220,846
香瓜 (Melon)	1,761	22,968
洋香瓜 (Cantaloupe)	2,520	34,755
總計 (Total)	19,599	385,893

資料來源：2018 年農業統計年報。

Reference：Agriculture Statistics Yearbook 2018.

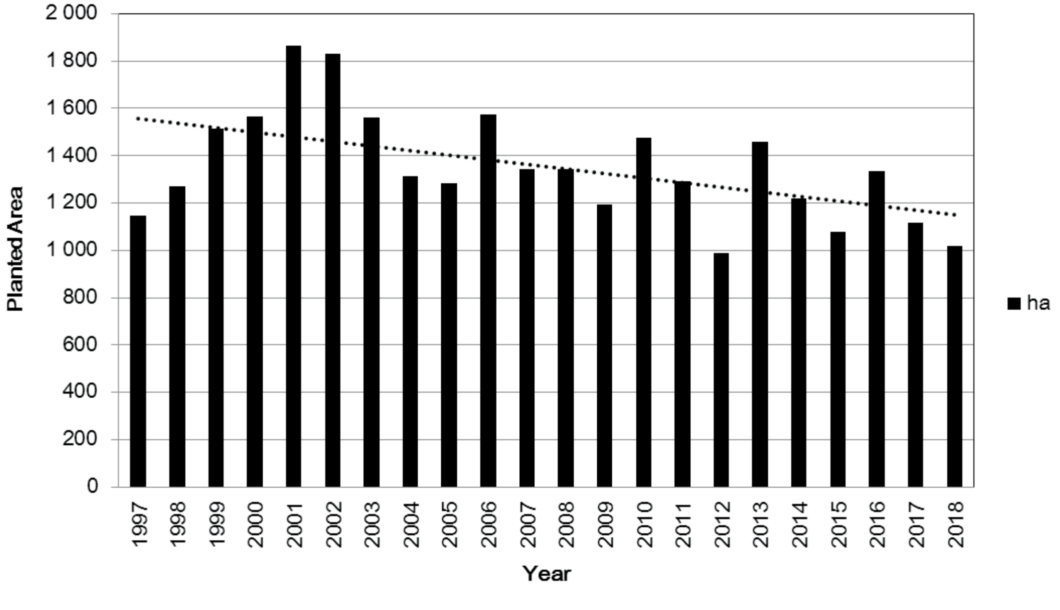
臺灣瓜類病毒病害

感染臺灣瓜類的病毒至少有 17 種[10,14]，包括蚜蟲傳播的有：甜菜西方黃化病毒 (*Beet western yellows virus,* BWYV)、瓜類蚜媒黃化病毒 (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、甜瓜蚜媒黃化病毒 (*Melon aphid-borne yellows virus*, MABYV)、甜瓜脈綠嵌紋病毒 (Melon vein-banding mosaic virus, MVbMV)、木瓜輪點病毒 (*Papaya ringspot virus*, PRSV)、絲瓜蚜媒黃化病毒 (Suakwa aphid-borne yellows virus, SABYV)、夏南瓜虎斑嵌紋病毒 (*Zucchini tigre mosaic virus*, ZTMV)、矮南瓜黃化嵌紋病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV)；薊馬傳播的有：海芋黃斑病毒 (*Calla lily chlorotic spot orthotospovirus*, CCSV)、甜瓜黃斑病毒 (*Melon yellow spot orthotospovirus*, MYSV)、番茄斑點萎凋病毒 (*Tomato spotted wilt orthotospovirus*, TSWV)、西瓜銀斑紋病毒 (*Watermelon silver mottle orthotospovirus*, WSMoV)；粉蝨傳播的有：瓜類退綠黃化病毒 (*Cucurbit chlorotic yellows virus*, CCYV)、南瓜捲葉菲律賓病毒 (*Squash leaf curl Philippine virus*, SLCPHV)、番茄捲葉新德里病毒 (*Tomato leaf curl New Delhi virus*, ToLCNDV)，及種子傳播的有：胡瓜綠斑嵌紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)。其中 CGMMV、CMV、MVbMV、MYSV、PRSV、ToLCNDV 及 ZYMV 還可經由病株汁液傳播。臺灣自 1944 年農家要覽即有瓜類病毒病害記錄，蚜蟲媒介傳播的病毒一直都是瓜類主要的流行病毒，包括 ZYMV、PRSV 及 CMV 以非永續性方式，CABYV 以永續性方式傳播。1990s 年代由南黃薊馬 (*Thrips palmi*) 以永續性方式傳播的 tospoviruses 崛起，WSMoV 及 MYSV 陸續成為主流病毒。銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii*) 入侵立足臺灣後，begomoviruses 靠其媒介傳播感染瓜類，其中 SLCPHV 為 2008 年以來造成洋香瓜絕產的流行病毒。2009 年中爆發另一粉蝨傳播的病毒~CCYV，短期內臺灣各種瓜類皆受其感染。若僅針對冬瓜作物品項，根據新版臺灣植物病害名彙[6]，有紀錄發生於臺灣冬瓜的病毒是：CGMMV、MABYV、MYSV、PRSV-W、SLCPHV、WSMoV、ZTMV 及 ZYMV 等。

(未完待續)

冬瓜病毒病發生情形

冬瓜 (Wax gourd, *Benincasa hispida* (Thumb.) Cogn.) 原產地在中國及印度，目前廣泛栽種於熱帶亞洲國家，在臺灣栽培供作蔬菜及加工冬瓜糖 (茶)，在 2005 年果實的零售價曾達到 40 元/公斤，但生產面積已有逐年下降趨勢，2018 年約有 1,019 公頃 (圖一)。早期農民種植冬瓜，種子多自行留種，長期下來造成品系混雜，果型不一[7]。與其他瓜類相比，冬瓜的生產方式較為粗放，以露地栽培為主，一般農民認為冬瓜生長勢強，栽培期間可忽略其健康管理，因此經常放任田間病蟲草害蔓延不已，導致其中病毒病全面發生，流行時已藥石罔效、果實絕產 (圖二)。冬瓜病毒病之病徵因品種不同而有所異，田間植株經常受多種病毒複合感染 (圖三)，無法由病徵直接分辨出感染的病毒種類，但主要會在葉面上出現葉綠素濃淡不均、斑駁嵌紋、黃化壞疽及葉片皺縮變形等病徵，在瓜蔓造成節間縮短，莖頂成簇生狀，新葉無法正常展開等現象。苗期感染則植株矮化萎縮，無法正常結果，生育中、後期感染則植株雖可結果但果實變小發育不良，果皮色澤不均，果實表面凹凸不平，有疣狀突起且果肉硬實。



圖一、1997- 2018 年冬瓜在臺灣的栽培面積。

Fig. 1. Planted area of wax gourd in Taiwan in 1997-2018.

圖二、冬瓜病毒病全面發生，果實絕產。

Fig. 2. Virus epidemics on field-grown wax gourd resulted in yielding abnormal fruits.

圖三、冬瓜田發生的 PRSV-W、WSMoV、ZYMV 及其交互感染所造成的葉片病徵。
Fig. 3. Symptoms of wax gourds caused by infection and mixed-infection of WSMoV, PRSV-W and ZYMV.

從 1998 年至 2001 年調查臺灣地區冬瓜病毒病發生情形，從霧峰、埔里、北斗、里港、吉安及鳳林等地經不同時期共採集 212 個樣本，每個樣本以 7 種抗體進行間接法免疫酵素分析 (indirect ELISA)，檢測包括 CABYV、CGMMV、CMV、MVbMV、PRSV-W、WSMoV 及 ZYMV。結果如表二，以 WSMoV、PRSV-W 及 ZYMV 為主要病毒[12]。以霧峰及北斗試驗田的調查資料分析 2002 至 2003 年每年兩期作的冬瓜發生病毒病的情形，結果如表三，發現一期作早期的病毒發生以 PRSV-W 為主，一期作末期及二期作早期即轉為 WSMoV 的發生高峰[12]，這些病毒交互感染，造成葉片及果實畸型，植株矮化甚至死亡，不但影響品質也影響產量。2004-2006 年進行田間抗病毒評估試驗，以兩期作流行病學調查的數據 (圖四、圖五) 計算各種病毒的配適模式[8]，PRSV-W 以 Monomolecular model 配適最好，SLCPHV、CABYV 及 WSMoV 都以 Linear model 配適最好，ZYMV 一期作以 Monomolecular model，二期作以 Linear model 配適最好。至於病害發生速率 (apparent infection rate) 估算值如表四，蚜蟲傳播的 PRSV-W 在田間最容易傳播。

表二、冬瓜病毒發生調查結果

Table 2. Incidence of viruses occurred on wax gourd (*Benincasa hispida*) in 1998-2001

		病毒種類							
日　期	地點	CABYV	CGMMV	CMV	MVbMV	PRSV-W	WSMoV	ZYMV	總數
98/04/04	埔里	0	0	0	0	2	6	0	7
98/08/25	吉安	0	0	0	0	1	1	1	4
98/08/25	鳳林	0	1	0	0	0	19	2	22
98/09/22	吉安	0	0	0	3	12	14	0	26
98/10/22	霧峰	0	0	0	0	0	0	0	2
99/12/30	里港	0	0	0	0	16	16	13	16
00/06/03	北斗	0	0	0	2	8	10	4	10
00/11/07	霧峰	0	0	0	0	1	0	0	1
01/01/09	霧峰	2	0	1	0	3	14	5	28
01/04/11	北斗	0	1	0	1	8	2	15	21
01/050/2	北斗	3	0	0	0	32	7	18	35
01/07/26	霧峰	0	0	1	1	0	6	1	27
01/08/09	霧峰	0	0	0	2	2	1	3	13
	總數	5	2	2	9	85	96	62	212

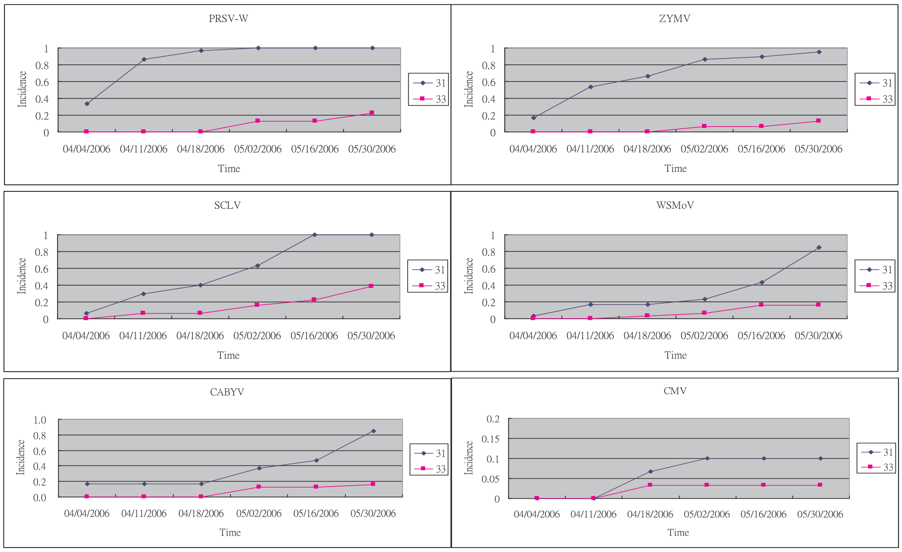
資料來源：鄧汀欽等，2006。作物病害管理技術研討會 p. 125-146。

表三、2002 至 2003 年一期作與二期作冬瓜病毒發生調查結果

Table 3. Incidence of viruses occurred on wax gourd in spring and summer during 2002-2003

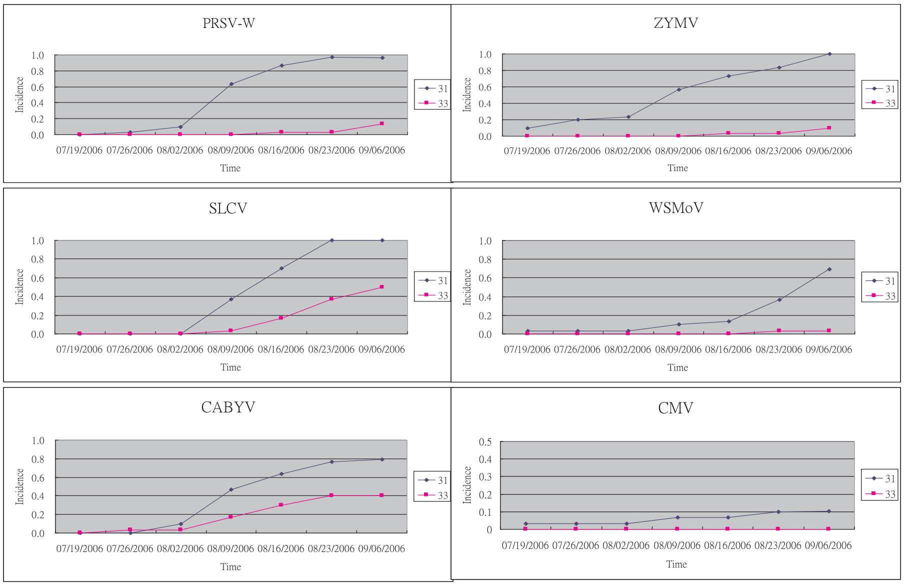
期　作	日期	CABYV	CGMMV	CMV	PRSV-W	WSMoV	ZYMV	總數
第一期作	2002/4/4	0	0	0	30	8	21	30
第一期作	2002/5/30	0	0	0	22	20	4	23
第二期作	2002/7/10	0	0	3	4	13	13	33
第二期作	2002/11/1	1	0	1	16	2	3	21
	合計	1	0	4	72	43	41	107
第一期作	2003/4/23	0	0	1	30	0	20	30
第一期作	2003/6/3	4	0	3	30	30	27	35
第二期作	2003/9/17	0	1	1	18	44	4	75
第二期作	2003/12/16	0	2	6	65	16	26	90
	合計	4	3	11	143	90	77	230
	總計	5	3	15	215	133	118	337

資料來源：鄧汀欽等，2006。作物病害管理技術研討會 p. 125-146。



圖四、第 1 期作‘W33’及‘W31’冬瓜品系感染 PRSV-W、ZYMV、CMV、SLCPHV、WSMV 及 CMV 之病勢進展曲線。.

Fig. 4. Disease progress curves of PRSV-W, ZYMV, CMV, SLCPHV, WSMV and CMV infecting wax gourds ‘W33’ and ‘W31’ in the spring season.



圖五、第 2 期作‘W33’及‘W31’冬瓜品系感染 PRSV-W、ZYMV、CMV、SLCPHV、WSMV 及 CMV 之病勢進展曲線。

Fig. 5. Disease progress curves of PRSV-W, ZYMV, CMV, SLCPHV, WSMV and CMV infecting wax gourds ‘W33’ and ‘W31’ in the summer season.

表四、試驗田感染冬瓜的病毒之病害發生速率

Table 4. Apparent infection rate of viruses infecting wax gourd in the experimental fields

病毒 (Virus)	病害發生速率 (Apparent infection rate, *r*)	
	一期作 (Spring)	二期作 (Summer)
PRSV-W	0.1213	0.0841
ZYMV	0.0480	0.0203
SLCPHV	0.0172	0.0256
WSMoV	0.0128	0.0132
CABYV	0.0118	0.0198

抗病毒冬瓜種原

農委會曾於 1986 年派遣作物引種團赴產地考察並引進國外作物種原，其中在印度蒐集的數個冬瓜地方種被分配到花蓮農改場試種，由於這些地方種在臺灣適應性良好，1988 年起開始進行系統性品種選育工作[(3)]，經篩選單株留種後以自交方式進行譜系選拔法育種，於 1991 年選出第 6 世代自交系‘IDA-V-172-3-5-2-6-1-8’「花蓮育 618 號」[(4)]。該品系於 1995 年及 1998 年委由農試所進行病毒抗病性檢定[(15)]，被發現其對機械接種的 CMV、PRSV-W 及 ZYMV 都具有免疫性 (表五)，此外，台中農改場亦發現「花蓮育 618 號」抗 WSMoV 的特性[(9)]。農試所擴大篩選測試 25 個國內外冬瓜種質 (germplasm)，結果如表六，其中 8 個臺灣的地方栽培品種，7 個都對 PRSV-W 極感病，17 個國外種原中，發現 2 個品系‘TVI 4204’與‘TVI 10064’完全不被 PRSV-W 感染，其中‘TVI 4204’與「花蓮育 618 號」均為來自印度的同一種原‘IDA-V-172’[(12)]。

表五、冬瓜品系對 ZYMV, CMV 或 PRV-W 抗病性測定之結果

Table 5. Responses of wax gourd lines to inoculation with ZYMV, CMV or PRV-W

冬瓜品系(種) Wax gourd line	抗病性測定反應 Response to inoculation with		
	ZYMV	CMV	PRSV-W
花蓮育 618 號	免疫 (Immune)	免疫 (Immune)	免疫 (Immune)
花蓮育 2246 號	抗病 (Resistant)	抗病 (Resistant)	抗病 (Resistant)
本地綠皮種	感病 (Susceptible)	感病 (Susceptible)	感病 (Susceptible)
TVI 4204	免疫 (Immune)	感病 (Susceptible)	免疫 (Immune)
農友細長	抗病 (Resistant)	感病 (Susceptible)	感病 (Susceptible)
TVI 11577	感病 (Susceptible)	感病 (Susceptible)	感病 (Susceptible)

表六、抗病檢測冬瓜種系接種 PRSV-W 的感染率

Table 6. Infection percentages of accession lines of wax gourd inoculated with PRSV-W for resistance screening

冬瓜品系(種) Accession line	來源 Geographic origin	接種株數 No. of inoculated plants	感染率 Infection (%)
TVI 10188	China	24	83
TVI 5850	China	24	17
TVI 5851	China	24	83
TVI 5852	China	24	96
TVI 10187	China	24	54
TVI 10937	China	17	24
TVI 4204	India	24	0
TVI 9605	Thailand	24	50
TVI 10064	Cambodia	24	0
TVI 8719	Vietnam	20	55
TVI 10687	Vietnam	24	96
TVI 10688	Vietnam	24	100
TVI 10689	Vietnam	24	100
TVI 10690	Vietnam	24	100
TVI 6044	Vietnam	24	54
TVI 10692	Vietnam	24	21
TVI 10693	Vietnam	24	96
TVI 8068	Taiwan（鳳山本地種）	23	43
TVI 10262	Taiwan（宜蘭本地種）	24	92
TVI 0100	Taiwan（屏東本地種）	24	83
TVI 8034	Taiwan（埔里本地種）	24	92
TVI 9618	Taiwan（清水本地種）	24	83
TVI 7296	Taiwan（彰化本地種）	24	96
TVI 11576	Taiwan（新寶本地種）	24	100
TVI 11577	Taiwan（北斗本地種）	24	92

資料來源：鄧汀欽等，2006。作物病害管理技術研討會p. 125-146。

「花蓮育 618 號」於 1998 年 9 月通過作物新品種審議，命名為「花蓮 1 號」，商品名「吉豐」，係小型冬瓜品種，植株葉片呈掌狀深缺刻，抗 PRSV-W 等病毒病，長日照下可開花結果，果形為長筒狀，果重 3-6 公斤，果長 35-50 公分，成熟後表面覆滿白色蠟粉，果實適合做涼拌、冬瓜盅等。春秋兩作的果實產量均高於「本地綠皮種」[(5)]。雖然「花蓮 1 號」的育成對於冬瓜小型化及抗病毒能力的提升有所助益，且因栽培容易目前仍有部份生產基地，然其自行留種無自交弱勢現象，種

子公司無承接品種權推廣的意願，且市場上對於果粉與口感嫌惡的聯結，使「花蓮 1 號」冬瓜難以獲得廣大消費族群的青睞。

抗病毒冬瓜品種育成

為了大宗冬瓜生產的需求，在 2003-2004 年於農試所進行雜交育種，利用‘TVI 4204× 宜蘭本地種’的後裔自交系為母本，‘TVI 4204× 北斗本地種’的後裔自交系為父本，篩選出抗病毒、果實細長型、無果粉之 F1 新品系‘W33’[2]。經溫室苗期人工接種試驗，‘W33’對 PRSV-W、CMV 及 ZYMV 之發病率皆低於「北斗本地種」。2004-2006 年進行區域試驗及田間抗病毒評估試驗，以流行病學調查數據，統計 3 個供試冬瓜品系的各種病毒之病勢進展曲線，其病勢進展曲線下面積 (Area under the disease progress curve, AUDPC) 如表七所示，在‘W33’所形成的 AUDPC，都比「北斗本地種」低，顯示‘W33’對這些病毒的抗病性，但是未達‘TVI 4204’的免疫境界[12]。

表七、不同病毒在各品系冬瓜田間所形成的 AUDPC 比較
Table 7. Comparative area under the disease progress curves (AUDPCs) of various viruses to each line of wax gourd in the field

期作 Season	冬瓜品系 Wax gourd line	病毒 (Virus) PRSV-W	ZYMV	SLCPHV	WSMoV	CABYV
一期作 (Spring)	W33	0.742	0.387	1.323	0.663	0.677
	北斗本地種	7.483	6.100	5.120	2.617	3.017
	TVI 4204	0.000	0.000	3.333	0.000	0.216
二期作 (Summer)	W33	0.217	0.183	1.250	0.083	1.533
	北斗本地種	3.715	4.033	3.567	1.556	3.143
	TVI 4204	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

資料來源：鄧汀欽等，2006。作物病害管理技術研討會p. 125-146。

雖然如此，田間病毒病抗性評估試驗結果如表八所示，‘W33’在發病率及發病度方面均優於兩對照品種而達顯著性差異，其中 2005 年與 2006 年春作，‘W33’完全未受病毒感染，而「北斗本地種」及「農友細長」發病率則在 80%以上，四次期作中，以 2005 年秋作種植於西螺試區病毒病發生最為嚴重，「北斗本地種」與「農友細長」均 100%發病且病勢嚴重，‘W33’發病率雖提昇為 22%，但發病度僅 5%[12]。‘W33’屬細長形中型冬瓜品種，果長 70-80 公分，果寬 14-18 公分，果重約 10-14 公斤，果肉白，果皮綠色無果粉，果內實心無空腔。株型普通，分枝性中等，生育強健，對日長感應較不敏感，夏季長日環境下可著果，春作播種至開花約需約 87 天 (秋作約 62 天)，子房細長型，著果數多，五次區域試驗中產量均顯著高於「北斗本地種」及「農友細長」[2]。據此，‘W33’於 2006 年 12 月通過品種權審議，命名為「台農二號」[1]，目前技術授權 2 家種子公司仍在推廣生產中。曾於 2007 年 9 月在於雲林縣古坑鄉福智麻園農場進行有機栽培試驗，結果試區內「台農二號」各種病毒發生率皆為 0% (圖六)，而對照的本地種冬瓜之病毒發生率為 75%，主要為 PRSV-W 或 SLCPHV，顯示「台農 2 號」冬瓜應用於有機栽培，不須施用化學藥劑即可有效防治病毒病。

表八、田間栽培環境下冬瓜品系間對病毒病抗性之差異

Table 8. Comparative disease incidences of wax gourd tested lines in the fields

期作別 Season	品系 Lines	發病率 Infection (%)		發病度 Severity (%)		試區 Region	調查日期 Date
2004 Fall	W33	8.3	a*	2.8	a	北斗	2004.12.30
	農友細長	88.9	b	46.1	b		
	北斗本地種	91.7	b	48.9	b		
2005 Spring	W33	0.0	a	0.0	a	北斗	2005.05.19
	農友細長	94.4	b	41.1	b		
	北斗本地種	100.0	b	48.3	b		
2005 Fall	W33	22.2	a	5.0	a	西螺	2005.11.11
	農友細長	100.0	b	76.7	b		
	北斗本地種	100.0	b	80.6	b		
2006 Spring	W33	0.0	a	0.0	a	里港	2006.01.17
	農友細長	79.2	b	34.2	b		
	北斗本地種	95.3	b	41.9	b		

* Values in each column having common letters are not significantly different at L.S.D. = 0.05 level.

資料來源：鄧汀欽等，2006。作物病害管理技術研討會p. 125-146。

圖六、抗病品種「台農二號」冬瓜以有機栽培，無須防治措施，病毒發生率 0%。
Fig. 6. Without control measures, virus incidence was 0% in the organically raised plants of wax gourd resistant cv. Tainong No. 2.

抗病遺傳分析

為輔助相關抗病種原篩選，及後續進行分析與標定抗病基因。選定‘TVI 4204’及‘TVI 11577’分別為抗病 (P1) 及感病 (P2) 之自交系親本，於農試所試驗田同時進行自交系持續純化及兩親本相互正反雜交以生產 F1 世代後裔。針對 P1、P2、F1 (‘TVI 4204’ ×‘TVI 11577’)、F2[(‘TVI 4204’ ×‘TVI 11577’)⊕]、BC1P1[‘TVI 4204’× (‘TVI 4204’ ×‘TVI 11577’)]及 BC1P2[‘TVI 11577’ × (‘TVI 4204’ × “TVI 11577’)]供試植株同時進行接種 PRSV-W，檢測各品系的抗病性，分為抗病及感病兩個等級，並依各族群之發病單株之分離比進行卡方檢定(Chi-square test) 以分析抗病基因之遺傳性，結果如表九所示，其 F2 族群抗感比極接近 1 : 3，證實‘TVI 4204’對 PRSV-W 免疫的基因由一對隱性基因所控制[12]。

表九、冬瓜品系 TVI 4204 與 TVI 11577 雜交組合對抗 PRSV-W 之分離率
Table 9. Segregation for resistance to PRSV-W in the cross TVI 4204 × TVI 11577

Generation (Line)[a]	Resistant	Susceptible	Expected ratio	χ^2	*P*
P_1 (TVI 4204)	35	0	-	-	-
P_2 (TVI 11577)	2	29	-	-	-
F_1 (TVI 4204×TVI 11577)	2 (0)[b]	33 (35)	-	-	-
F_2 (TVI 4204×TVI 11577)⊕	44 (44)	131 (131)	1:3	0.002	0.97
BC_1P_1 (TVI 4204×F1)	32 (35)	38 (35)	1:1	0.510	0.47
BC_1P_2 (TVI 11577×F1)	2	68	-	-	-

[a] TVI 4204 and TVI 11577 are the parental resistant and susceptible lines, respectively.
[b] In parentheses, expected number of plants for single locus segregation.
資料來源：鄧汀欽等，2006。作物病害管理技術研討會p. 125-146。

抗病基因分子標誌搜尋、鑑定與應用

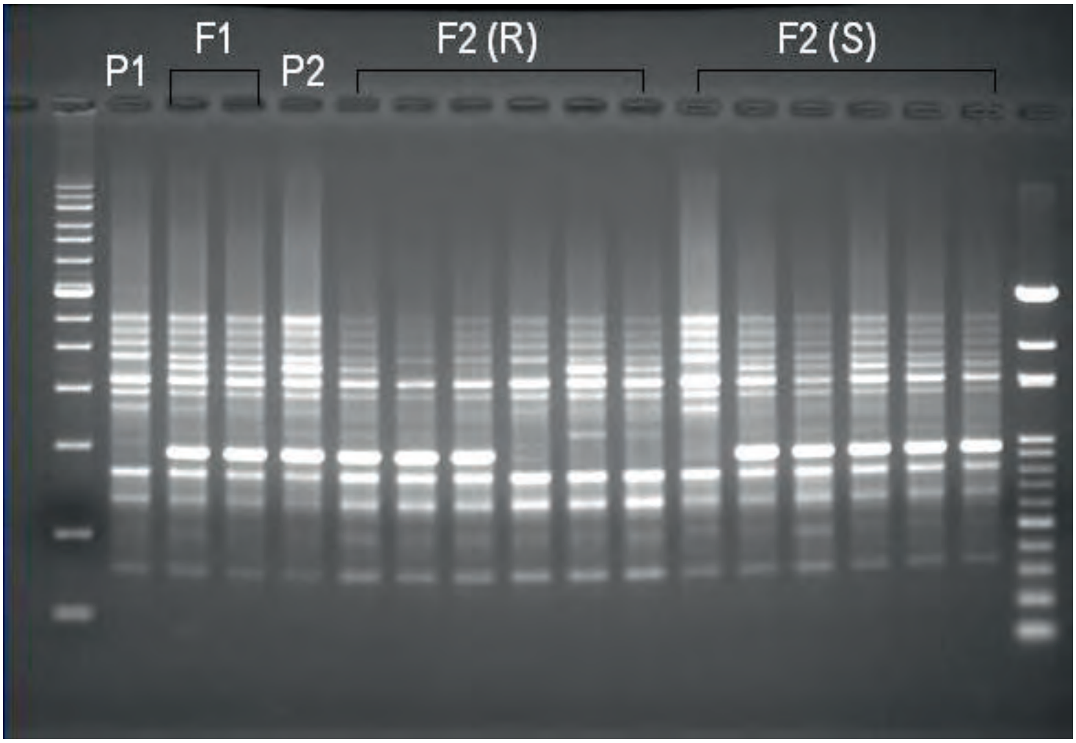
針對親本品系 (包括 P1 抗病及 P2 感病品系)、F2、BC1P1 及 BC1P2 等族群，依接種 PRSV-W 抗病毒檢定結果，由抗病及感病族群中逢機選取植株，純化萃取 genomic DNA，利用集團分離分析 (Bulked segregate analysis, BSA) 進行 PCR 分析，搜尋對親本具多型性的核酸引子對，以為遺傳鑑定分析及進一步基因標定或選殖之基礎：

(一) 逢機擴大多型性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)

利用逢機引子搜尋抗病基因外，亦優先利用已尋獲對親本具多型性的 RAPD 核酸引子進行分析，選拔多型性標誌，結果顯示由 52 組引子中獲得父母本間具有多型性標誌有 15 組引子，其中 11 組由父母本及雜交 F1 子代與抗、感病材料間有一致性，但雜交 F2 子代的多型性標誌與抗、感間的反應不一致 (圖七)，推測 RAPD 的多型性標誌與抗、感病性可能不具聯鎖 (linkage) 關係。

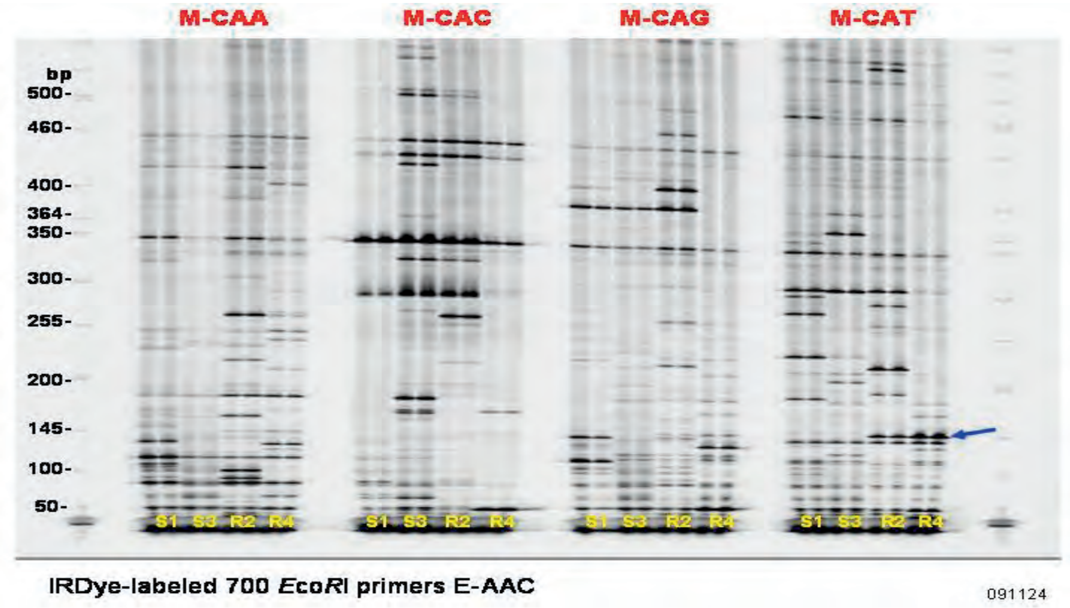
(二) 擴增片段長度多型性分析 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP)

利用 IRDye Fluorescent AFLP kit (LI-COR, USA)，完成全部 64 種組合的引子對選擇性擴增，分析其結果顯示其中的 8 組在感病品系和 1 組在抗病品系具有專一之多型性條帶 (圖八)。經過膠體切割、回收、純化後，依據其 MseI/EcoRI 組合的引子對再次進行 PCR 擴增，共得到 9 個片段條帶，送核酸定序，依據核酸序列的差異，共設計 9 組引子對。以感病冬瓜 (農友細長) 及抗病冬瓜 (TVI 4204) 的子葉 genomic DNA 作為模版進行 touchdown PCR，結果未能在抗病或感病植株間得到有具明顯差異性的片段[13]。



圖七、逢機擴大多型性 DNA 進行抗病基因標定分析，獲得父母本間具多型性標誌。其中父母本及 F1 子代與抗、感間有一致性，但雜交 F2 子代的多型性標誌與抗、感間不一致。

Fig. 7. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis shows two forms of polymorphism between parents' disease resistance genes. The forms of polymorphism of parents and F1 progeny have consistency between resistance and susceptibility, but that was inconsistent in the F2 progeny.



圖八、擴增片段長度多型性分析，抗病(R2 或 R4) 與感病(S1 或 S3) 族群所呈現的多型性圖譜。箭頭所指為 M-CAT 引子所擴增出來在抗病族群才有的條帶。

Fig. 8. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) showed the polymorphisms presented by resistant (R2 or R4) and susceptible (S1 or S3) groups. The arrow indicated the bands amplified by the M-CAT primer on the disease-resistant population.

冬瓜抗病毒機制

經上述接種試驗，選定‘TVI 4204’及‘TVI 11577’分別為抗病及感病供試品系。進行以下試驗[11]：

(一) 頂劈嫁接

如表十，以抗病品種‘TVI 4204’為砧木，感病品種「農友細長」或‘TVI 11577’當接穗經頂劈嫁接成活後，PRSV-W 接種試驗分為 4 種處理方式：(1) 接穗接種、(2) 砧木接種、(3) 砧木及接穗同時接種或 (4) 砧木上接種 7 天後再接種接穗。另以感病品系‘TVI 11577’為砧木，抗病品系‘TVI 4204’為接穗，同樣的處理進行接種 PRSV-W 試驗。結果，抗病品系‘TVI 4204’無論是當砧木或接穗其組織均不被 PRSV-W 感染，但也未能防止 PRSV-W 侵染感病品系‘TVI 11577’的組織。PRSV-W 在抗病品系‘TVI 4204’植株體內都無法複製，但‘TVI 4204’組織產生的成分並不傳輸到感病品系的組織，或傳輸到也無抗病毒的抗生作用發生；反之，感病冬瓜‘TVI 11577’植株體內產生的感病成分也不傳輸或影響到抗病品系的組織進行抗生作用。

表十、抗(R)感(S)品種項劈嫁接後接種 PRSV-W 之結果
Table 10. Responses of split grafted resistant (R) and susceptible (S) lines of wax gourd to inoculation with PRSV-W

砧木 (Stock)	接穗 (Shooting)	接種處理方式 (Inoculation)	接穗新葉呈現病徵 (With Symptoms)
TVI 4204 (R)	TVI 11577 (S)	接種接穗葉	＋
TVI 4204 (R)	農友細長 (S)	接種接穗葉	＋
TVI 11577 (S)	TVI 4204 (R)	接種接穗葉	－
TVI 4204 (R)	TVI 11577 (S)	接種砧木葉	－
TVI 11577 (S)	TVI 4204 (R)	接種砧木葉	－
TVI 4204 (R)	TVI 11577 (S)	同時接種砧木及接穗	＋
TVI 11577 (S)	TVI 4204 (R)	同時接種砧木及接穗	－
TVI 4204 (R)	TVI 11577 (S)	接種砧木 7 天後接種接穗	＋
TVI 11577 (S)	TVI 4204 (R)	接種砧木 7 天後接種接穗	－

(二) 側接嫁接

如表十一所示，以抗病品系‘TVI 4204’為砧木，感病品系‘TVI 11577’或「農友細長」當接穗，經側接嫁接成活後，PRSV-W 接種試驗分為 2 種處理方式：(1) 砧木及接穗同時接種、(2) 砧木接種 7 天後再接種接穗。另以感病品系‘TVI 11577’為砧木，抗病品系‘TVI 4204’為接穗，同樣的處理進行接種 PRSV-W 試驗。結果，側接嫁接後同根生的植株接種 PRSV-W，抗病品系‘TVI 4204’的葉部組織未出現病徵，且未有病毒檢出，感病品系‘TVI1577’的葉部組織則有明顯病徵。顯示‘TVI4204’對病毒的免疫性可抗嫁接傳播，但其免疫性無法經維管束輸導作用轉送至感病的冬瓜葉部組織以啟發抗病作用 (圖九)。

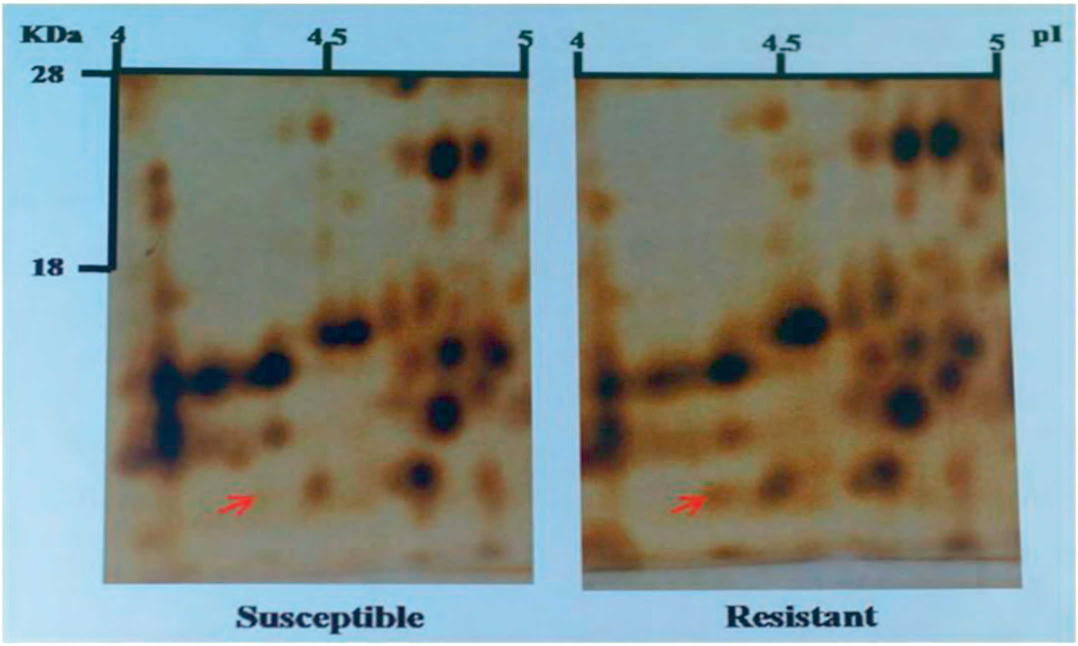
表十一、 抗 (R) 感 (S) 品種側嫁接後接種 PRSV-W 之結果
Table 11. Responses of side grafted resistant (R) and susceptible (S) lines of wax gourd to inoculation with PRSV-W

砧木 (Stock)	接穗 (Shooting)	接種處理方式 (Inoculation)	呈現病徵(砧木/接穗) With symptoms (Stock / Shooting)
TVI 11577 (S)	農友細長 (S)	同時接種砧木及接穗	＋ / ＋
TVI 4204 (R)	TVI 11577 (S)	同時接種砧木及接穗	－ / ＋
TVI 11577 (S)	TVI 4204 (R)	同時接種砧木及接穗	＋ / －
TVI 4204 (R)	TVI 11577 (S)	接種砧木 7 天後接種接穗	－ / ＋
TVI 11577 (S)	TVI 4204 (R)	接種砧木 7 天後接種接穗	＋ / －

圖九、嫁接後同根生的植株接種 PRSV-W，抗病品系‘TVI 4204’ (左上) 的葉部組織未出現病徵，病品系‘TVI1577’ (右下) 則有明顯病徵。

Fig. 9. After grafting and inoculation of PRSV-W, no symptom showed in the leaf tissues of resistant line ‘TVI 4204’(upper left), while obvious symptoms developed on the diseased leaves of susceptible line‘TVI1577’ (lower right).

以 2-D-PAGE 技術進行抗或感病植株間蛋白質體表現的差異性，分離自抗病品系樣本才出現的蛋白質條帶 (圖十)，經 MALD1-TOF 分析及與資料庫比對，證實此蛋白質乃具有抗病功能的 14-3-3 family protein，經純化製備其抗體，以 ELISA 及 Western blot 比較檢測冬瓜及胡瓜品種 (系) 外表型屬抗病或感病的植株產生該蛋白的量，結果卻無法由試驗顯示出差異性。目前其他有關 14-3-3 family protein 的研究顯示其與植物抗病反應有關，有機會將在不同生長期與感染期進一步測試其在各部位組織的產生與分佈。



圖十、抗感病冬瓜品系以 2-D-PAGE 鑑別蛋白質體的差異，分離自抗病(Resistant)品系的樣本出現箭頭所指特殊的條帶。

Fig. 10. Difference in the performance of proteasomes between resistant and susceptible lines of wax gourd by using 2-D-PAGE, the arrow indicated the specific zone appeared in the resistant line.

結論與展望

抗病品種可以用來突破作物生產受限於疫情的發展，同時降低防疫管理成本，避免農藥濫用，可謂是最經濟有效的作物管理策略。目前已尋獲極抗病的冬瓜品種，即使種植在發病嚴重的疫區，對 ZYMV、PRSV-W 及 CMV 等病毒也不需防疫措施，自然省了農藥的施用。然而進行抗病育種除需時間外，還需育種栽培及植物保護等方面之專業研究人員進行通盤的考量方能有效執行。抗病毒冬瓜品系具有的抗病基因決定了植物對病毒的免疫性，其獨特的功能可應用於改善瓜類之生產，因此這個功能性基因的應用極具商業價值。除了直接轉殖應用之外，利用其分子標誌來輔助篩選抗病品系，可大幅縮短抗病育種的時程，以往 BSA 一般只適合單基因性狀之標定，其分析的結果雖較為粗略，但對於欠缺基本資料之植物種類，若所探討之性狀符合單基因或主要受到一個主效基因控制，仍可藉由 BSA 法來建立與該遺傳性狀相關之連鎖標誌。RAPD 及 AFLP 都曾被我們用來蒐

尋多型性標誌，可惜結果不如理想。過去的研究對於冬瓜功能性基因缺乏基本遺傳資料可資參考致功敗垂成，近年來核酸解序技術的進步日新月益，次世代定序 (next generation sequencing, NGS) 使生物功能性基因的標定與解析一蹴可幾，若以現有抗病或感病親本及其後裔族群的冬瓜為標的材料，利用 NGS 進行對該抗病毒基因的搜尋、標定、與解序，即可水到渠成。

謝　　辭

我們要感謝 1980s 年代農試所瓜類病毒研究團隊黃秋雄、張清安、許秀惠、張有明等諸位先進奠定本研究的基礎，蕭吉雄博士引領本項研究的抗病育種，2000 年後劉邦基博士開拓出分生領域，中興大學生物科技學研究所團隊黃秀珍教授等參入基因體學及蛋白質體學研究；也要感謝一直以來工作夥伴完成的實驗室與田間的勞務與雜務使研究得以持續。此外，歷年來籌畫及執行與本研究相關的計畫如下，在此一併致上謝忱：92 農科- 1.8.1.農-C2、93 農科-4.2.1-農-C1、94 農科-5.2.1-農-C1(5)、96 農科-4.2.2-農-CC、97 農科-1.1.5-農-C1、98 農科-1.1.7-農-C1(1)、99 農科-1.1.7-農-C1(1)、100 農科-4.2.3-農-C1(3)、101 農科-9.1.1-農-C2、102 農科-9.1.1-農-C1。

引用文獻

1. 林子凱、王三太、王毓華、鄧汀欽、蕭吉雄。2006。冬瓜新品種‘台農 2 號’之育成。技術服務 68: 16-18。
2. 林子凱、鄧汀欽、蔣國司、賴信宏、王三太、王毓華、蕭吉雄。2006。冬瓜抗病毒病品系‘W33’之培育。臺灣園藝 52: 536-537。(摘要)
3. 林學詩。1990。冬瓜純系選種試驗初報。花蓮區農業改良場研究彙報 6: 53-61。
4. 林學詩。1993。冬瓜品種改良試驗。蔬菜作物試驗研究彙報第 7 輯 p. 59-67。高雄區農業改良場編印。
5. 林學詩、全中和。2000。冬瓜新品種「花蓮 1 號」(吉豐)之育成及其特性。花蓮區農業改良場研究彙報 18: 1-13。
6. 曾顯雄、曾國欽、張清安，蔡東纂、嚴新富。2019。臺灣植物病害名彙 (第五版)。中華民國植物病理學會出版。329 pp。
7. 張有明。1982。冬瓜品種純化及改良試驗。蔬菜作物試驗研究彙報第一輯 p. 25-38。農林廳編印。

8. 賴信宏、蔣國司、鄧汀欽、林子凱、蔡錦慧。2006。冬瓜雙生病毒之流行病學研究。植病會刊 15: 309。(摘要)
9. 趙佳鴻、陳慶忠、鄧汀欽。 1999。 冬瓜新品種-花蓮育 618 對西瓜銀斑病之抗性探討。植保會刊 41: 307-308。(摘要)
10. 鄧汀欽。2011。三十年來臺灣瓜類病毒病害的流行趨勢演變。農作物害蟲及其媒介病害整合防治技術研討會專刊 p. 147-163。農業試驗所特刊第 152 號。
11. 鄧汀欽、蔡錦慧、林子凱、廖吉彥、劉邦基。2004。冬瓜病毒病發生調查及利用嫁接檢試‘TVI4204’ 自交系對 PRSV-W 的免疫性。植保會刊 46: 419。(摘要)
12. 鄧汀欽、林子凱、蔣國司、蔡錦慧、賴信宏、廖吉彥、蕭吉雄。2006。應用抗病品種防治瓜類病毒病。作物病害管理技術研討會專刊 p. 125-146。
13. 鄧汀欽、蔡惠玲、林子凱、蔡錦慧、陳美君、廖吉彥。2010。抗病冬瓜品系對 PRSV-W 免疫基因的分子標誌之 AFLP 分析。植病會刊 19: 98-99。(摘要)
14. Chen, Y. K., Shih, P. R., Chao, H. Y., Chang, T. K., and Wu, Y. C. 2018. Emerging occurrence of *Zucchini tigre mosaic virus* (ZTMV) on wax gourd (*Benincasa hispida*). J. Plant Med. 60: 69-70.
15. Deng, T. C., Tsai, C. H., Chang, C. A., Hsiao, C. H., and Chyuan, J. H. 1998. Immunity of wax gourd‘Hualin Yu 618’to three mechanically transmissible viruses. Plant Pathol. Bull. 7: 223-224. (Abstract)
16. Deng, T. C., Lin, T. K., Chang, Y. M., Chiang, K. S., Tsai, C. H., Lai, H. H., Chang, C. A., and Hsiao, C. H. 2006. The breeding of a commercial line of wax gourd (*Benincasa hispida*) resisted to multiple viruses. p.71-91. *In* Symposium of International Workshop on the Cucurbit Diseases and Resistance Breeding.

ABSTRACT

From Hopeless Shifted to be Curable without Chemical Treatments: The Performance of a Virus-Resistant Variety of Wax Gourd in the Past, Present and Future

Deng, T. C.[1], Lin, T. K.[2], Chiang, K. S.[3], Hu, C. C.[4], Liao, J. Y.[1], Tsai, C. H.[1], Lin, M. J.[1]

1. Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.
2. Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.
3. Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.
4. Graduate Institute of Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

Various kinds of cucurbits are wildly cultivated in Taiwan. Due to the annual planting in a large area, cucurbit plants are susceptible to virus infection and cause serious damages. Even pesticides have been abused; the viral diseases cannot be effectively controlled. For disease management of crop production, application of disease-resistant varieties should be the approach to get through the limiting factor. As growing resistant varieties, viral diseases were effectively controlled and no pesticides were required. However, the germplasm with true disease-resistance is rare in nature and the genes from disease resistant germplasm are not always available in practice. In the programs about cucurbit breeding, we found a line of wax gourd with good innate resistance to viruses, and then following a series of genetic analysis, search, identification and application of related genes belonged to this line were described in this report. In addition to that, through backcrossing, the disease resistance gene was introduced into a local cultivar to breed a new commercial variety. By passing the official review of variety rights, the variety was named as "Tainong No. 2", and the variety rights have transferred to 2 seed companies with variety authorization. After the cultivar releasing for planting, the viral diseases originally were no way to be controlled had been shifting to be no need to care in the field management of wax gourd production. Especially, the use of disease-resistant varieties had created common interests for seedling dealers and growers, while avoiding pesticide abuse and naturally maintaining ecological safety. In-depth research and value-added applications of virus resistant genes in the wax gourd are also the contents of this article.

Key words: Cucurbits, Virus, Disease management, Resistance gene, Germplasm.